

На правах рукописи

МУРТАЗИНА НАИЛЯ РАШИДОВНА

**ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЫСОКО- И
НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

02.00.02 – аналитическая химия

А в т о р е ф е р а т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Казань – 2004

Работа выполнена на кафедре аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Казанского государственного университета им. В.И. Ульянова-Ленина» Министерства образования и науки Российской Федерации

Научный руководитель: доктор химических наук,
профессор Эльвина Павловна МЕДЯНЦЕВА

Официальные оппоненты: доктор химических наук, доцент
Сергей Юрьевич ГАРМОНОВ
кандидат химических наук, доцент
Софья Сауловна БАБКИНА

Ведущая организация: Башкирский государственный университет

Защита состоится «16» декабря 2004 г. в 14 часов на заседании диссертационного Совета К 212.081.04. по химическим наукам Казанского государственного университета по адресу: г. Казань, ул. Кремлевская, 18, Химический институт им. А.М. Бутлерова, Бутлеровская аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета.

Отзывы на автореферат просим присылать по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, КГУ, Научная часть.

Автореферат разослан «16» ноября 2004 г.

Ученый секретарь диссертационного Совета,
кандидат химических наук

Шайдарова Л.Г.

Актуальность темы: Разработка экспрессных, точных и чувствительных способов определения физиологически активных соединений – одна из актуальных задач современной аналитической химии. Исследования в этой области стимулируются потребностями медицины, ветеринарии, пищевой промышленности, необходимостью мониторинга окружающей среды. Особый интерес представляют биохимические методы, которые в последнее время получают все большее распространение. Среди них доминирующее положение занимает иммуноанализ, как наиболее подходящий для эффективного, быстрого и недорогого определения большого количества образцов. Интерес к иммунохимическим методам анализа связан еще и с возможностью относительно простого варьирования селективности анализа по отношению к ряду соединений, в основном за счет использования антител с различной специфичностью. Исследования, проводимые в настоящее время, включают разработки в области мультианализа, когда анализируют содержание не только индивидуального соединения, но группу соединений, обладающих родственными структурными особенностями, либо принципиально различные по структуре.

Определение высоко- и низкомолекулярных лекарственных соединений имеет как практическое, так и теоретическое значение для изучения их свойств, содержания в сыворотке крови и других матрицах, влияния на организм человека и животных, фармакокинетики, структуры синтезированных соединений и биохимических реакций с их участием. Лекарственные соединения, как и многие физиологически активные вещества, способны оказывать положительное или отрицательное воздействие на организм в зависимости от дозы, длительности воздействия и метаболизма в конкретном организме. Кроме того, в связи с широким применением высокоэффективных лекарств и в других областях жизнедеятельности (например, в сельском хозяйстве) в воде и пищевых продуктах могут содержаться остатки этих препаратов в количествах, превышающих безопасный уровень. В связи с требованиями повышения качества жизни и увеличением поступлений фальсифицированной продукции на фармацевтический рынок, в последнее время необходимы разнообразные варианты количественного определения широкого круга лекарств, включающих высоко- и низкомолекулярные соединения, для оценки их качества, а также для определения их содержания в организме человека и животных.

Научный консультант по вопросам электрохимии биологически активных соединений – д.х.н., профессор, академик МАНВШ, академик РАЕН **Г.К. Будников**, научный консультант по вопросам, связанным с методом поляризации флуоресценции – к.х.н., в.н.с. **С.А. Еремин**.

Работа является частью исследований по основному научному направлению химического факультета Казанского государственного университета «Развитие теоретических и прикладных основ методов определения малых количеств биологически активных веществ» (№ гос. регистрации 0120107141) и проводилась при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 03-03-33116, и Министерства образования РФ, проект А03-2.11-24 (грант для поддержки научно-исследовательской работы аспирантов высших учебных заведений).

Цель исследования заключалась в разработке новых вариантов иммуноанализа высоко- и низкомолекулярных лекарственных соединений на примере двух форм высокомолекулярного белка рибонуклеазы (панкреатической и микробной рибонуклеазы) и низкомолекулярных антимикробных препаратов сульфаниламидного класса, выборе параметров аналитических систем для определения, как индивидуальных соединений, так и группы родственных соединений, с помощью амперометрических иммуно- и иммуноферментных сенсоров, а также поляризационного флуоресцентного иммуноанализа.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- получить необходимые иммунореагенты – конъюгаты (соединения с высокомолекулярным носителем), трейсеры (соединения с низкомолекулярным носителем). Охарактеризовать их различными методами, определить содержание компонентов, степень связывания, устойчивость при хранении. Предложить способ иммобилизации и соиммобилизации иммунореагентов, в том числе, фермента, специфичных антител, конъюгатов, на поверхности планарного платинового электрода для получения биочувствительной части иммуно- и иммуноферментных сенсоров;
- разработать варианты определения высоко- и низкомолекулярных лекарственных соединений с помощью иммуно- и иммуноферментных сенсоров с амперометрическим детектированием и поляризационного флуоресцентного иммуноанализа, используя полученные иммунореагенты;
- определить и сопоставить аналитические характеристики предлагаемых конкурентных и неконкурентных вариантов определения рибонуклеаз и сульфонамидных лекарственных соединений;
- обосновать схемы вариантов иммуноанализа и провести апробацию разработанных методик на различных объектах;
- выявить особенности способов определения, как индивидуальных соединений, так и группы близких по структуре соединений.

Научная новизна: Разработаны варианты конкурентного и неконкурентного электроиммуноанализа высокомолекулярных соединений – двух форм рибонуклеаз (барназы и биназы) и низкомолекулярного лекарственного соединения сульфаметазина, основанные на использовании амперометрических иммуно- и иммуноферментных сенсоров, и варианты конкурентного поляризационного флуоресцентного иммуноанализа низкомолекулярных лекарственных соединений сульфонамидного ряда (сульфаметазина, сульфадиазина, сульфаниламида). Впервые синтезированы конъюгаты панкреатической рибонуклеазы и бутирилхолинэстеразы, а также конъюгаты бычий сывороточный альбумин–сульфаметазин и антитела–холинэстераза. Показана возможность определения удельной активности фермента в полученных конъюгатах. Получены различные по структуре и составу конъюгаты соединений сульфонамидного ряда с производными флуоресцеина (трейсеры). Выявлено влияние структуры конъюгатов гаптен-антител на специфичность антител, оценена специфичность иммунореагентов по отношению к структурно-подобным соединениям. Предложены наилучшие пары антитела – меченый антиген для наиболее чувствительного определения, как индивидуальных соединений, так и группы структурно-родственных соединений.

Практическая значимость: Предложены варианты иммуноанализа для определения РНКазы А и сульфонамидных препаратов (сульфаметазина, сульфаниламида) в лекарственных формах, сыворотке крови, пищевых продуктах (молоко), природной воде. Разработаны методики пробоподготовки таблеток сульфаметазина с использованием метанола, ацетонитрила, гидроксида калия и хлороводородной кислоты, а также способы пробоподготовки молока с помощью щавелевой и трихлоруксусной кислот для определения содержания сульфаниламида.

На защиту выносятся:

- новые варианты иммуноанализа высоко- и низкомолекулярных лекарственных соединений на примере двух форм рибонуклеаз и сульфонамидных препаратов с помощью амперометрических иммуно- и иммуноферментных сенсоров и поляризационного флуоресцентного иммуноанализа;
- получение иммунореагентов и их характеристика, определение молярного соотношения компонентов;
- выбор условий функционирования иммуноаналитических систем и определение их аналитических характеристик;
- параметры аналитических систем для определения индивидуальных соединений или группы родственных соединений.

Апробация работы: Материалы диссертации докладывались и обсуждались на XVII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Казань, 2003); V

Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды «Экоаналитика-2003» с международным участием (Санкт-Петербург, 2003); IV Всероссийской конференции молодых ученых «Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии» (Саратов, 2003); VIIth International Conference on Agri-Food Antibodies (Uppsala, 2003); Всероссийской конференции, посвященной 100-летию со дня рождения академика И.П. Алимарина «Аналитика России» (Москва, 2004).

Публикации: По теме диссертации опубликовано 8 работ. Из них 2 статьи в международном и отечественном рецензируемых научных журналах и 6 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях.

Структура и объем работы: Диссертация изложена на _____ страницах машинописного текста, содержит 20 таблицы и 44 рисунка. Работа состоит из введения, пяти глав, выводов, списка литературы, включающего __ ссылок.

В первой главе представлен обзор литературы по иммунохимическим методам определения физиологически активных соединений разных классов, включающих высоко- и низкомолекулярные соединения, описание объектов исследования с точки зрения их физиологической активности и других свойств, а также существующие био- и иммунохимические методы определения объектов исследования.

Вторая глава содержит постановку задачи, методы и условия эксперимента.

Третья глава посвящена разработке иммуно- и иммуноферментных сенсоров с амперометрическим детектированием на основе планарных электродов для определения двух форм рибонуклеаз (барназы и биназы) в неконкурентном и конкурентном форматах иммуноанализа.

В четвертой главе описано получение и характеристика конъюгатов гаптен-белок и антитела-фермент для проведения конкурентного иммуноанализа сульфаметазина с помощью амперометрического иммуносенсора.

В пятой главе представлены варианты поляризационного флуоресцентного иммуноанализа низкомолекулярных лекарственных соединений на примере сульфонамидов. Обсуждается специфичность антител и селективность иммуноанализа в условиях варьирования структуры иммунореагентов для наиболее чувствительного определения, как индивидуального соединения, так и группы структурно-родственных соединений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методы исследования: Электрохимические измерения проводили с помощью многоцелевого электрохимического детектора «МЕВ». Основой для

иммуноферментных сенсоров (ИФС) служили четырехканальные планарные платиновые электроды фирмы BVT Technologies (Brno, Czech). Электродом сравнения служила серебряная проволока, впаянная в рабочую микроячейку, которая при работе в растворе иодидсодержащего субстрата БТХИ образует псевдо-иодидсеребряный электрод. Для работы использовали ячейку объемом 200 мкл, сделанную из фторопласта.

Поляризацию и интенсивность флуоресценции измеряли на приборе Beacon 2000 фирмы PanVera (Wisconsin, USA), а также на приборе TDx Analyzer фирмы Abbott Laboratories (Illinois, USA) в статическом режиме при 25°C. Для измерений использовали боросиликатные кюветы.

Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре Hitachi U-2000 (Japan).

Объекты исследования: Применяли химически чистый препарат кристаллической рибонуклеазы А (РНКазы А) фирмы «Диа М» (Москва), а также химически чистый препарат РНКазы *Bacillus intermedius*, полученный на кафедре микробиологии Казанского государственного университета. Сульфаметазин (СМЗ), сульфадиазин (СДЗ), сульфаниламид (САМ) и другие сульфонамиды были приобретены в фирме «Sigma» (Poole, Dorset, UK).

В работе применяли поликлональные антитела против РНКазы, полученные иммунизацией кроликов коммерческим препаратом фермента.

Использовали антисыворотки к сульфонамидам, полученные 1) на амидную группу производных сульфаниламида, 2) на ароматическую аминогруппу общего фрагмента сульфонамидов. Применяемые антисыворотки подразделяются на три группы:

1) Антисыворотка, специфичная к группе нескольких сульфонамидов, полученная после иммунизации овец смесью семи конъюгированных с бычьим сывороточным альбумином (БСА) фталевых производных сульфонамидов (сульфадиметоксина, сульфатиазола, сульфадиазина, сульфаметазина, сульфаметоксазола, сульфаметизола, сульфаметоксипиридазина), каждый из которых пришивается к белку через общую ароматическую аминогруппу. Такая антисыворотка представляет собой смесь поликлональных антител с разной специфичностью. Антисыворотка любезно предоставлена Dr. Ramadan Abuknesha (King's College, London, UK).

2) Антисыворотки с индивидуальной специфичностью к сульфонамидам, полученные путем иммунизации овец конъюгатами овальбумина с сукцинатами сульфадиазина и сульфаметазина. Антисыворотки предоставлены для исследований Dr. Roy Jackman (Veterinary Laboratories Agency, New Haw, Surrey KT15 3NB, UK).

3) Антисыворотки с групповой специфичностью к нескольким сульфонидам, полученные против конъюгатов синтетического гаптена N-сульфанил-4-аминобутановой кислоты с овалбумином и соевым ингибитором трипсина. Антисыворотки были предоставлены для исследований проф., д.х.н. Б.Б. Дзантиевым (Институт биохимии РАН им. А.Н. Баха, Москва).

Применяли бутирилхолинэстеразу (ХЭ) с активностью 29 АЕ/мг, изготовленную НПО «Биомед» (Пермь, Россия). В качестве субстрата холинэстеразы использовали бутирилтиохолин иодид (БТХИ) фирмы «ICN Biomedicals Inc.» (Ohio, USA).

Получение иммунореагентов: Синтез конъюгатов производных сульфаметазина с белками и трейсеров (соединений гаптенных с аминопроизводными флуоресцеина) проводили с помощью метода активированных эфиров. Конъюгат ХЭ-РНКаза получали с помощью селективной модификации белка за счет активации α -аминогрупп N-терминальных аминокислот глутаровым альдегидом. Конъюгат антитела против сульфаметазина-ХЭ получали с помощью водорастворимых карбодиимидов.

ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

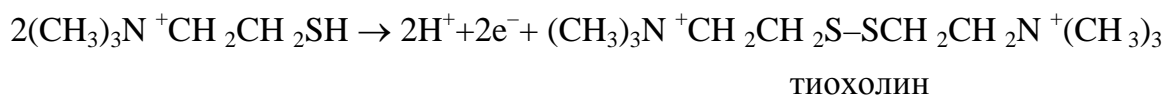
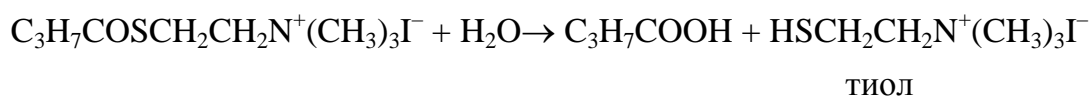
В качестве объектов исследования выбраны две формы РНКазы и антимикробные сульфаниламидные препараты. Как лекарственный препарат РНКазы обладают противовирусным, противоопухолевым действием. Количественная характеристика содержания РНКазы дает возможность избирательно регулировать механизм ее противоопухолевого действия. Кроме того, определение содержания некоторых других форм РНКаз существенно для оценки процесса опухолевого ангиогенеза. Существует необходимость определения РНКазы, независимо от ее каталитической активности, например, в виде денатурированных молекул или в комплексах с другими соединениями. Сульфониамиды обладают широким спектром антимикробного действия. В настоящее время их применение в медицине ограничено лечением бронхитов и инфекций мочеполовой системы, они применяются также в ветеринарии для профилактики, лечения заболеваний животных и в качестве генераторов их роста.

При разработке новых способов иммунохимического определения лекарственных соединений было использовано несколько подходов: в том числе, предложены различные варианты электроиммуноанализа и поляризационного флуоресцентного иммуноанализа, рассмотрены их аналитические возможности. Сочетание иммунологической, биокаталитической и электрохимической реакций

лежит в основе функционирования иммуно- и иммуноферментных сенсоров. Явление поляризации флуоресценции связано с процессами поглощения плоскополяризованного света и эмиссии флуоресценции меток низкомолекулярного соединения после его связывания в комплекс антиген-антитело.

Иммуноанализ рибонуклеаз и сульфонамидных препаратов с помощью амперометрических иммуно- и иммуноферментных сенсоров

Принцип детектирования амперометрических иммуноферментных сенсоров основан на регистрации тока окисления продукта ферментативного гидролиза субстрата БТХИ (тиола) с помощью холинэстеразы, которая в данном случае выступает в качестве ферментной метки:



Изучено влияние иммунореагентов (антигенов, специфичных антител и иммунного комплекса) на иммобилизованную ХЭ, которая входила в состав биочувствительной части амперометрического биосенсора. Установлено, что РНКазы не обладают собственной электрохимической активностью и способностью изменять каталитическую активность иммобилизованной холинэстеразы (ИХЭ) на фоне трис-буфера (рН 7,8) при потенциале 500 мВ. Сульфаметазин также не обладает собственной электрохимической активностью в изучаемых условиях. В области концентраций СМЗ 1–100 мкг/мл наблюдалось небольшое увеличение каталитической активности ХЭ (2–7 нА) по сравнению со средним значением тока окисления продукта ферментативной реакции в отсутствие соединения. Эффект незначительного увеличения каталитической активности фермента зависит от концентрации сульфаметазина. Однако величина этого эффекта не позволяет использовать его в качестве аналитического сигнала.

Исходя из полученных результатов, была предпринята попытка разработки иммуно- и иммуноферментных сенсоров на основе планарных платиновых электродов для определения РНКаз и сульфаметазина.

Конкурентное и неконкурентное иммунохимическое определение РНКаз

Предложены варианты электроиммуноанализа РНКаз с помощью амперометрических иммуносенсоров в конкурентном и неконкурентном формате иммуноанализа.

Для получения биочувствительной части иммуносенсоров в неконкурентном варианте для определения РНКаз проводили совместную иммобилизацию антител против РНКазы и фермента ХЭ на рабочую поверхность платинового электрода с помощью глутарового альдегида. В конкурентном электрохимическом иммуноанализе РНКазы на поверхность электрода иммобилизовали антитела против РНКазы. Каталитическая активность иммуноферментных сенсоров и иммунологическая активность антител сохранялась в течение не менее месяца.

С целью выбора наилучших условий функционирования иммуносенсоров варьировали потенциал, концентрацию субстрата, рН (рис. 1) и природу буфера, соотношение иммобилизованных ХЭ и антител. Были выбраны следующие параметры аналитических систем: рН трис буфера 7,8; потенциал – 500 мВ; концентрация субстрата БТХИ – 1 мМ; разведение антител для иммобилизации – 1:50 для неконкурентного иммуноанализа РНКазы (рис. 2) и 1:5 – для конкурентного варианта иммуноанализа РНКазы.

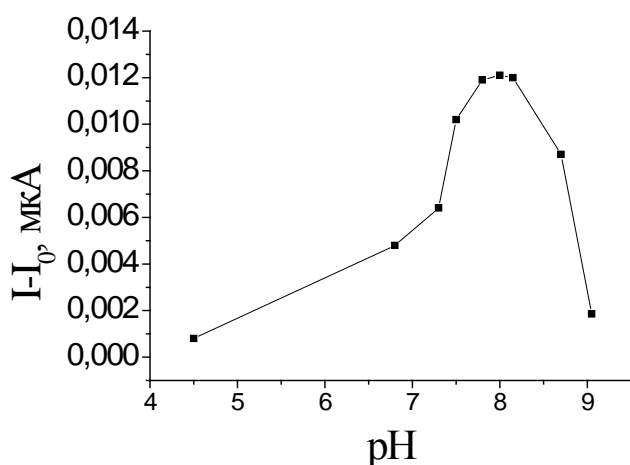


Рис. 1. Зависимость тока окисления продукта гидролиза субстрата (I , мкА) от величины рН при $E = 500$ мВ.

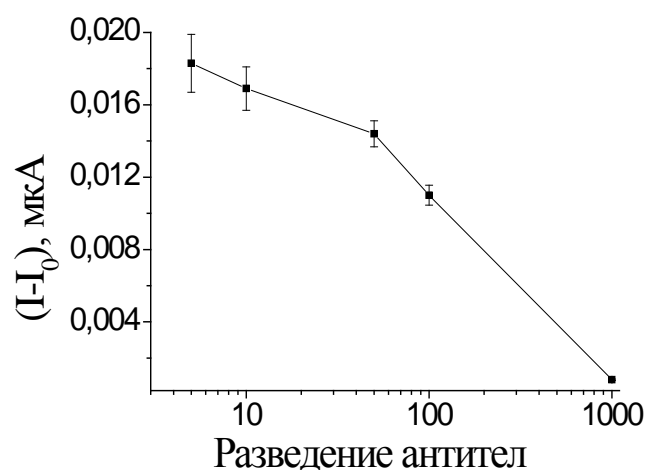


Рис. 2. Зависимость тока окисления продукта гидролиза субстрата (I , мкА) от разведения антител против РНКазы в неконкурентном варианте анализа в присутствии РНКазы (1 мг/мл) при $E = 500$ мВ.

Неконкурентный вариант иммуноанализа основан на эффекте ингибирования каталитической активности ИХЭ вследствие образования иммунного комплекса на поверхности электрода. Это отражается в уменьшении тока окисления субстрата по сравнению с сигналом в отсутствие аналита. Аналитические характеристики и возможности этого варианта иммунохимического определения панкреатической и микробной РНКазы представлены в табл. 1.

Таблица 1.

Аналитические характеристики градуировочных зависимостей
для определения панкреатической и микробной РНКаз
с помощью амперометрического иммуноферментного сенсора

Форма РНКазы	Линейный интервал концентра ций, мг/мл	IC ₅₀ , мг/мл	Уравнение градуировочного графика $I=a(-\lg C)\pm b$		r
			$a \times 10^{-3}$	$b \times 10^{-3}$	
Барназа	$1-1,6 \times 10^{-3}$	0,3307	$3,34 \pm 0,03$	$11,68 \pm 0,04$	0,9986
Биназа	$1-1 \times 10^{-2}$	0,2359	$8,11 \pm 0,06$	$19,37 \pm 0,07$	0,9990

Максимальная степень ингибирования процесса ферментативного гидролиза, что отражается в уменьшении тока окисления тиола, в присутствии антигена составляет $(75,5 \pm 0,5)$ и $(91,2 \pm 0,3)\%$, нижняя граница определяемых концентраций (c_n) – 1,2 и 3,1 мкг/мл, для панкреатической РНКазы и РНКазы *Bacillus intermedius*, соответственно. Большая кросс-реактивность используемых поликлональных антител по отношению к обеим РНКазам (100 и 140% для РНКазы А и РНКазы *Bacillus intermedius*, соответственно) объясняется структурным сходством их молекул. Известно, что степень гомологии РНКазы А и РНКазы *Bacillus intermedius* составляет 85%.

Правильность разработанного варианта иммуноанализа проверена методом «введено-найдено» (табл. 2).

Таблица 2.

Определение рибонуклеазы А с помощью амперометрического
иммуноферментного сенсора в неконкурентном варианте ($n = 3$; $P = 0,95$)

Концентрация антигена, мг/мл		% открытия	S _r
Введено	Найдено		
2×10^{-1}	$(1,87 \pm 0,05) \times 10^{-1}$	93,5	0,01
2×10^{-2}	$(2,07 \pm 0,08) \times 10^{-2}$	103,5	0,02
2×10^{-3}	$(2,1 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	105	0,03

Применение неконкурентного иммуноанализа РНКаз ограничено в тех случаях, когда необходимо их определять в виде возможных соединений, особенно высокомолекулярных, например, с белками, которые могут образовываться в организме. Поэтому более привлекательным становится конкурентный иммуноанализ с использованием ферментной метки.

Конкурентный вариант иммуноанализа предполагает конкуренцию анализируемого соединения и его меченого аналога за центры связывания иммобилизованных антител. При фиксированной концентрации антител равновесное соотношение концентраций связанного и свободного антигена зависит от его общей концентрации. Для проведения конкурентного иммуноанализа РНКазы синтезирован конъюгат РНКазы с холинэстеразой.

Конъюгат очищали с помощью гель-фильтрации и характеризовали методами вольтамперометрии и спектрофотометрии. Для определения количества ХЭ в конъюгате использовали зависимость величины тока окисления продукта ферментативного гидролиза на платиновых электродах от количества нативной ХЭ. Уравнение линейной зависимости $I = (0,175 \pm 0,001) + (0,115 \pm 0,001) \times \lg C_{ХЭ}$, $r = 0,9992$, где I – ток окисления тиола (мкА), $C_{ХЭ}$ – концентрация активного фермента в объеме ячейки (мг/мл). Концентрация ХЭ в конъюгате составила 1,29 мг/мл. Количество РНКазы вычисляли по уравнению градуировочного графика зависимости оптической плотности при 278 нм (максимум поглощения белков, обусловленный поглощением ароматических групп) от концентрации РНКазы в смеси РНКазы с ХЭ, где концентрация ХЭ остается постоянной и равной концентрации ХЭ в конъюгате. Уравнение линейной зависимости оптической плотности смеси от концентрации РНКазы имеет вид: $A = (1,98 \pm 0,08) + (1,35 \pm 0,23) \times \lg C_{РНКазы}$, где A – оптическая плотность смеси белков, $C_{РНКазы}$ – концентрация РНКазы (мг/мл). Количество РНКазы в конъюгате, вычисленное по этому уравнению, составило 0,21 мг/мл. Таким образом, молярное соотношение компонентов конъюгата ХЭ:РНКазы – 1:5. Активность ХЭ после конъюгирования вычисляли по формуле: $Act = (I - I_0) \times \alpha / (t \times m \times V)$, где I – среднее значение тока окисления продукта ферментативной реакции (мкА); I_0 – ток в холостом опыте (мкА); α – коэффициент, равный 0,766 (мМ/мкА); t – время ферментативной реакции, мин; m – масса активного фермента, мг/мл; V – объем раствора ХЭ или конъюгата (мл). Удельная активность фермента в конъюгате составила 0,028 мМ/мг×мин.

Практическое выполнение конкурентной схемы иммунохимического анализа с амперометрическим детектированием предполагает осуществление следующих стадий:

- получение конъюгата РНКазы-ХЭ;
- приготовление исследуемого раствора для анализа (смесь аналита, содержащего неизвестное количество РНКазы, конъюгата и буферного раствора);
- инкубирование исследуемого раствора в присутствии иммуносенсора с иммобилизованными антителами;

- удаление несвязавшегося с иммобилизованными антителами конъюгата и антигена (РНКаза);
- добавление раствора субстрата фермента;
- регистрация наблюдаемого аналитического сигнала и определение аналита.

Область изученных концентраций в данном варианте анализа составляет $1-5 \times 10^{-6}$ мг/мл. Линейный интервал определяемых концентраций составил $1-7,6 \times 10^{-5}$ мг/мл и ему соответствует уравнение $I/I_0(\times 100\%) = (16,55 \pm 0,25) + (-17,97 \pm 0,10) \times \lg C_{\text{РНКаза}}$, $r = 0,9993$. Нижняя граница определяемых концентраций составляет 21 нг/мл.

Амперометрический иммуносенсор для определения сульфаметазина

Для конкурентного иммуноферментного определения сульфаметазина был разработан амперометрический иммуносенсор, причем, если в иммунохимическом анализе РНКазы ХЭ являлась меткой для антигена, в этом случае ХЭ выступает в качестве метки антител.

Для проведения конкурентного иммуноферментного анализа сульфаметазина с помощью амперометрического иммуносенсора были синтезированы и охарактеризованы различными методами конъюгаты СМЗ – БСА и антитела – ХЭ. Иммобилизованный в виде конъюгата с белком антиген конкурирует со свободным антигеном за связывание с антителами, находящимися в растворе. Вслед за стадией отделения иммунных комплексов, образовавшихся на поверхности электрода, от иммунных комплексов в объеме раствора, его количество фиксируется после добавления субстрата, специфичного ферменту-метке.

Для характеристики конъюгата СМЗ-БСА применяли известные методы определения концентрации белков Бредфорд и Фолина. Для построения градуировочных графиков зависимости оптической плотности от концентрации белка использовали БСА в области концентраций 0,001–0,1 мг/мл (метод Фолина), 5–50 мкг/мл (метод Бредфорд) и разведения конъюгата от 1:2 до 1:100. Содержание белка определяли согласно уравнениям линейного участка градуировочных зависимостей при 595 нм (метод Бредфорд), при 500 и 750 нм (метод Фолина), количество БСА, определенное этими методами, составило 0,12 мг/мл и 0,11 мг/мл, соответственно. Содержание гаптена определяли по УФ-спектрам поглощения смесей, приготовленных на основе растворов белка с концентрацией 0,5 мг/мл и различных концентраций сульфаметазина (область концентраций 0,0001–0,01 мг/мл). Количество гаптена в конъюгате определяли при 260 нм по уравнению линейной зависимости оптической плотности раствора от концентрации сульфаметазина: $A = (6,214 \pm 0,037) + (2,957 \pm 0,023) \times \lg C$, $r = 0,9999$, где A –

оптическая плотность, C – концентрация сульфаметазина (мг/мл). Оно составило 0,01 мг/мл. На основе полученных результатов соотношение компонентов в конъюгате подсчитано как 1:21. Соотношение белок-гаптен при синтезе конъюгата составляло 1:42.

Удельная активность фермента в конъюгате составила 0,68 мМ/мг×мин. Удельная активность, подсчитанная для нативной ХЭ, – 0,79 мМ/мг×мин. Для проведения конкурентного определения использовали разведение конъюгата 1:3.

Область изученных концентраций в данном конкурентном варианте иммуноанализа составляет 100–0,001 мкг/мл. Линейный интервал определяемых концентраций составил 0,01–2,1 мкг/мл. Нижняя граница определяемых концентраций – 5,3 нг/мл.

Применение разработанных амперометрических иммуно- и иммуноферментных сенсоров для анализа объектов

Возможности применения разработанных амперометрических иммуносенсоров для анализа конкретных объектов показаны на примере определения РНКазы А в таблетках и модельных растворах на фоне сыворотки крови. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3.

Определение рибонуклеазы в лекарственном препарате и на фоне сыворотки крови с помощью иммуно- и иммуноферментных сенсоров ($n = 3$; $P = 0,95$)

Вариант ИФА (объекты анализа)	Концентрация антигена, мг/мл		% открытия	S_r
Неконкурентный (спрессованные таблетки, «СамсонМед», Санкт-Петербург)	Введено	Найдено		
	1×10^{-2}	$(0,97 \pm 0,05) \times 10^{-2}$	97	0,02
	5×10^{-3}	$(4,92 \pm 0,06) \times 10^{-3}$	98,4	0,05
	1×10^{-3}	$(1,05 \pm 0,07) \times 10^{-3}$	105	0,07
Конкурентный (сыворотка крови)	2×10^{-2}	$(1,97 \pm 0,04) \times 10^{-2}$	98,5	0,02
	2×10^{-3}	$(2,04 \pm 0,06) \times 10^{-3}$	102	0,03
	2×10^{-4}	$(1,95 \pm 0,07) \times 10^{-4}$	97,5	0,04

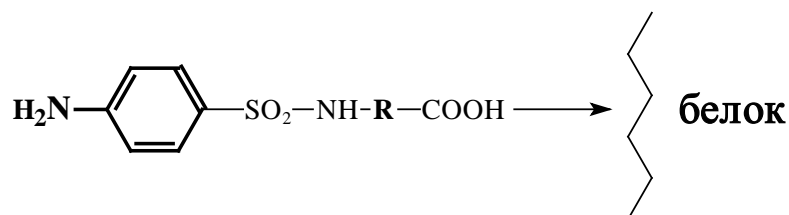
Поляризационный флуоресцентный иммуноанализ низкомолекулярных лекарственных соединений на примере сульфонамидов

Если проведение иммуноанализа с амперометрическим детектированием требует меток или конъюгатов, обеспечивающих электрохимическую активность соответствующих соединений для получения аналитического сигнала, то метод

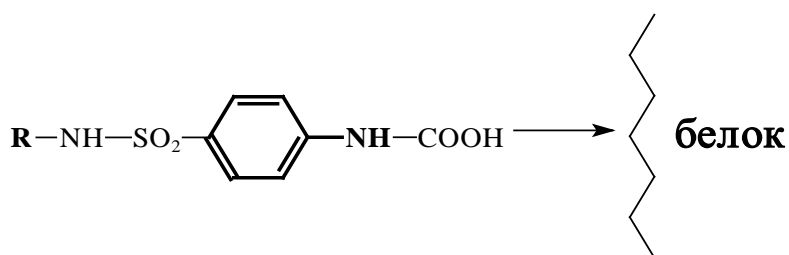
поляризации флуоресценции основан на применении флуоресцентных меток. Аналитическим сигналом в данном методе выступает величина поляризации флуоресценции, пропорциональная времени релаксации при повороте молекулы на определенный угол.

Рассмотрены варианты конкурентного поляризационного иммуноанализа некоторых сульфонамидов – сульфаметазина, сульфадиазина и сульфаниламида. Иммуноанализ основан на конкуренции между аналитом и его меченым флуоресцеином аналогом за центры связывания антител. Учитывая современные тенденции решения аналитических задач, когда анализируют содержание не только отдельного соединения, но группы соединений, обладающих родственными структурными особенностями, представляло интерес разработать варианты иммуноанализа, как для чувствительного определения индивидуальных соединений, так и для определения группы нескольких сульфонамидов. С этой целью в работе использовали антитела с различной специфичностью, полученные после иммунизации животных производными сульфонамидов, конъюгированных с белком-носителем разными способами:

- связывание с белком через амидную группу сульфонамида



- связывание с белком через общую ароматическую аминогруппу сульфонамида



Варьировали структуру трейсеров, типы флуоресцентных меток (этилендиаминофлуоресцеинтиокарбамат (ЭДФ), 5-([4,6-дихлоротриазин-2-ил]амино)-флуоресцеин (ДТАФ), флуоресцеин-5-изотиоцианат (ФИТС)), а также использовали гомологичные и гетерологичные пары гаптен-трейсер и антитела-трейсер.

Иммунохимическое определение индивидуальных сульфонамидов

При разработке варианта поляризационного флуоресцентного иммуноанализа сульфаметазина использовали смесь поликлональных антител, полученных на общий сульфаниламидный фрагмент, и трейсер с меткой этилендиаминофлуоресцеинтиокарбамат с дополнительным мостиком между гаптенем и меткой. Нижняя граница определяемых концентраций в этом случае составила 6 нг/мл, а линейный интервал концентраций 0,05–25,7 мкг/мл.

Сопоставление результатов определений сульфаметазина с помощью амперометрического иммуносенсора и поляризационного флуоресцентного иммуноанализа по рассчитанным и табличным значениям F - и t -критериев ($F_{\text{расч.}}(18) < F_{\text{табл.}}(19)$, $(t_{\text{расч.}}(3,9) < t_{\text{табл.}}(4,3))$) показало, что методы является равноточными в диапазоне определяемых концентраций, а расхождения между средними результатами незначимы. Разработанные методы являются точными и позволяют проводить определение сульфаметазина на уровне нг/мл.

Из сульфонамидных препаратов сульфаметазин и сульфадиазин наиболее широко используются в сельском хозяйстве. Поэтому необходимы способы индивидуального определения этих сульфонамидов. Для проведения иммуноанализа сульфадиазина и сульфаметазина использовали антитела, полученные против конъюгатов этих соединений, в которых индивидуальная R-группа сульфонамида была удалена от носителя и максимально доступна для распознавания антителами. Оценивали кросс-реактивность антител по отношению к соединениям сульфонамидного ряда. Большинство изученных сульфонамидов слабо связывались с изучаемыми антителами: кросс-реактивность $< 0,1\%$. Кросс-реактивность антител по отношению к сульфамеразину более существенна (4,8%), по сравнению с остальными соединениями этого класса, что может быть обусловлено его структурой: он отличается от сульфадиазина присутствием в структуре пиримидинового кольца одной метильной группы.

В табл. 4 представлены аналитические характеристики градуировочных зависимостей (Γ_3) для определения сульфадиазина и сульфаметазина с помощью гомологичных (СДЗ-ДТАФ и СМЗ-ДТАФ, для СДЗ и СМЗ, соответственно) и гетерологичных трейсеров, а также с использованием гомологичных и гетерологичных антител, полученных против СДЗ и СМЗ.

Таким образом, показана возможность определения индивидуальных соединений сульфонамидного ряда.

Таблица 4.

Аналитические характеристики градуировочных зависимостей для определения сульфадиазина и сульфаметазина с помощью различных трейсеров и антител с индивидуальной специфичностью

Параметры		Трейсер СДЗ-ДТАФ		Трейсер СМЗ-ДТАФ	
		Среднее значение	S	Среднее значение	S
Антитела против СДЗ	C_n (нг/мл)	0,2	0,1	0,9	0,3
	IC_{50} (нг/мл)	4,2	0,7	6,0	0,8
	линейный участок ГЗ (нг/мл)	0,54–32	–	0,9–42	–
	коэффициент чувствительности	0,86	0,08	0,71	0,07
Антитела против СМЗ	C_n (нг/мл)	2,1	0,2	4	2
	IC_{50} (нг/мл)	1900	560	240	86
	линейный участок ГЗ (нг/мл)	100–36600	-	34–1715	–
	коэффициент чувствительности	0,45	0,05	0,71	0,13

Особенности иммуноанализа группы структурно родственных соединений

При анализе реальных объектов, в большинстве случаев неизвестно, какой именно сульфонамид содержится в образце, поэтому варианты определения группы нескольких сульфонамидов весьма актуальны. Предложены варианты иммуноанализа группы сульфонамидов с помощью антител, обладающих групповой специфичностью. Для этой цели исследовали поликлональные антитела двух типов: 1) смесь поликлональных антител, полученных на индивидуальную группу нескольких сульфонамидов; 2) антитела, полученные на общий фрагмент всех сульфонамидов с помощью синтетического гаптена N-сульфанил-4-аминобутановой кислоты.

В первом случае использовали гомологичные и гетерологичные пары трейсер – стандарт, причем исследовали ингибирование сигнала в присутствии, по крайней мере, семи сульфонамидов и двух производных гаптен. Сравнительная оценка значений кросс-реактивности смеси поликлональных антител по отношению к некоторым сульфонамидам, в том числе к тем, которые применялись для получения иммуногена (сульфатиазол, сульфадиазин, сульфаметазин, сульфаметоксазол), с использованием всех исследуемых трейсеров представлена на

рис. 3. Общая картина распознавания исследуемых сульфонамидов антисывороткой показывает, что данная антисыворотка обладает наибольшим сродством к сульфатиазолу (СТЗ), сульфаметоксазолу (СМК), сульфамеразину (СМР). Антисыворотка весьма чувствительна к СТЗ независимо от трейсера, и может применяться для определения сульфатиазола с чувствительностью до 1 нг/мл.

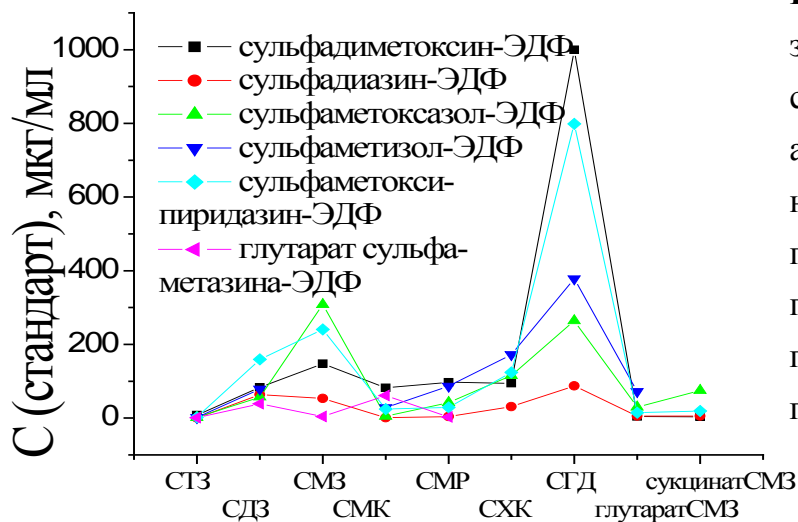


Рис. 3. Сравнительная оценка значений кросс-реактивности смеси поликлональных антител по отношению к некоторым сульфонамидам и производным сульфаметазина при $mP = 0,5$ с использованием гомологичных и гетерологичных трейсеров.

Высокая чувствительность достигается при детектировании производных сульфонамидов (глутарата СМЗ и сулцината СМЗ). В общем, наблюдается закономерность в повышении чувствительности при использовании гомологичных пар трейсер–сульфонамид. Антисыворотка обладает малым сродством к сульфатуанидину (СТД), сульфаметазину и сульфаксимином (СХК). Однако, подбирая условия проведения иммуноанализа и варьируя структуру трейсеров можно повысить чувствительность определения, например, это наблюдается для сульфаметазина.

Выбор структуры гаптена для получения иммуногена является одним из основополагающих моментов для получения антител, обладающих специфичностью к нескольким сульфонамидам. Напряжение, вызываемое переменными частями сульфонамидов (R-группами), оказывает различное влияние на общий сульфаниламидный фрагмент, так что он проявляет разные для каждого отдельного сульфонамида стерические и электронные свойства. Поэтому синтетические производные сульфаниламида по сравнению с сульфонамидами могут быть подходящими гаптенами для реализации высокой кросс-реактивности антител, так как они не содержат «мешающей» R-группы.

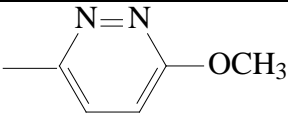
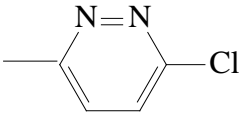
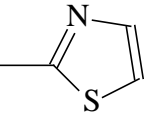
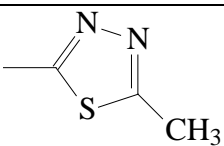
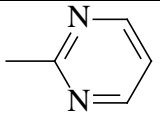
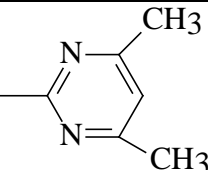
Предложен новый синтетический гаптен N-сульфанил-4-аминобутановая кислота (САБ) для получения антител против сульфонамидов. Структура гаптена близка к структуре сульфаниламида и отличается наличием остатка бутановой

кислоты. Карбоксильную группу, удаленную от общего сульфонамидного фрагмента, пришивали к аминогруппам белкового носителя для получения иммуногена. Использовали различные белки для конъюгирования гаптена. Исследовали связывание полученных антител с гаптеном, меченым флуоресцентной меткой, в зависимости от природы белка носителя и цикла иммунизации. Наилучшие характеристики (титр антител, значения s_n , IC_{50}) были получены при использовании антител против гаптена, конъюгированного с соевым ингибитором трипсина (СИТ) после третьего цикла иммунизации.

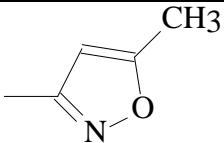
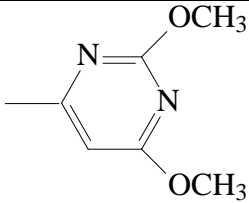
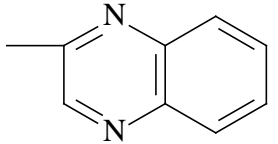
Антисыворотка обладает принципиально новой специфичностью по отношению к группе нескольких сульфонамидов. Значения кросс-реактивности для некоторых сульфонамидов приведены в табл. 5.

Таблица 5.

Кросс-реактивность антител против N-сульфани-4-аминобутановой кислоты по отношению к соединениям сульфонамидного ряда

Сульфонамид	R-группа	IC_{50} , мкг/мл	Кросс- реактивность, %
Сульфаниламид (САМ)	H	0,7	100
Сульфагуанидин (СГД)	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{NH}_2 \end{array}$	0,8	96
Сульфаметоксипиридазин (СМП)		1,0	75
Сульфахлорпиридазин (СХП)		2,6	28
Сульфатиазол (СТЗ)		10,2	7
Сульфаметизол (СМТ)		12,4	6
Сульфадиазин (СДЗ)		16,5	4
Сульфаметазин (СМЗ)		17,0	4

Продолжение табл. 5.

Сульфаметоксазол (СМК)		55	1
Сульфадиметоксин (СДМ)		121	<1
Сульфахиноксалин (СХК)		94	<1

Антисыворотка высоко специфична по отношению к сульфаниламиду, сульфагуанидину, сульфаметоксипиридазину и сульфаклорпиридазину. Средние значения кросс-реактивности были получены для сульфатиазола, сульфаметизола, сульфаметазина и сульфадиазина. Остальные изученные сульфонамиды дают слабое связывание (<1%). Очень низкое значение кросс-реактивности получено для сульфахиноксалина, в структуру которого входят два сопряженных бензольных кольца. Наиболее близкие по структуре соединения – сульфаниламид и сульфагуанидин распознаются антителами с кросс-реактивностью 100 и 96%, соответственно.

Определение сульфонамидов в различных объектах

Вариант поляризационного флуоресцентного иммуноанализа сульфаметазина был опробован при определении его содержания в речной воде (р. Воронеж, г. Липецк) и в таблетках сульфаметазина (производства ФГУП «Мосхимфармпрепараты» им. Н.А. Семашко, 0,5 г). Концентрацию сульфаметазина в определяемых образцах рассчитывали согласно уравнению $mP = ((112,5 - 34,613)/(1 + C/0,8827)^{0,5686}) + 34,613$ (уравнение градуировочной зависимости для определения СМЗ) в пределах линейной зависимости.

Известно, что результаты определения зачастую зависят от пробоподготовки образцов, поэтому при определении сульфаметазина в таблетках рассмотрены и сопоставлены методики пробоподготовки с использованием метанола, ацетонитрила, гидроксида калия и хлороводородной кислоты в качестве растворителей. Результаты определений, наиболее близкие к фармакопейной прописи содержания сульфаметазина, наблюдаются при использовании ацетонитрила и 0,1 М HCl (табл. 6).

Таблица 6.

Результаты определения сульфаметазина в таблетках, (n = 3; P = 0,95)

Растворитель	Разведени е порошка таблеток	Значение поляризации флуоресценции , mP	Рассчитано, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	Открыт ие, %
метанол	1:100000	91,4±4,5	0,21	0,15±0,06	71
ацетонитрил		86,1±4,8		0,20±0,04	95
HCl (0,1M)		88,3±4,0		0,22±0,08	104
KOH (0,1M)		—		—	—
метанол	1:20000	74,4±3,1	1,1	0,84±0,20	78
ацетонитрил		71,8±1,3		1,03±0,11	94
HCl (0,1M)		70,8±3,3		1,14±0,30	104
KOH (0,1M)		61,7±2,7		2,67±0,62	243
метанол	1:10000	65,7±4,3	2,1	1,81±0,59	86
ацетонитрил		64,0±2,6		2,14±0,38	102
HCl (0,1M)		64,4±3,1		2,05±0,52	98
KOH (0,1M)		50,2±3,7		10,1±3,9	481

В речной воде не было обнаружено сульфаметазина, что было подтверждено методом «Введено-найденно» (табл. 7).

Таблица 7.

Результаты определения сульфаметазина в речной воде, (n = 3; P = 0,95)

Концентрация СМЗ, мкг/мл	Значение поляризации флуоресценции (mP)	Найдено, мкг/мл	Открытие, %
0	104±3	0	100
0,25	77±4	0,26±0,11	104
0,5	72±1	0,51±0,07	102
1	66±3	1,0±0,3	99
10	47±1	10,5±1,4	105
20	43±2	19,4±5,2	97

Возможность применения антисыворотки против N-сульфанил-4-аминобутановой кислоты для иммуноанализа сульфонамидов в реальных объектах

показана на примере определения сульфаниламида в искусственно приготовленных образцах на основе молока (1,5%, производитель – Очаковский молочный комбинат, г. Москва).

Разработаны и сопоставлены методики пробоподготовки молока, которые включают разбавление боратным буфером, преципитацию с помощью щавелевой и трихлоруксусной кислот. Были выбраны те способы пробоподготовки, при которых влияние матрицы было минимально: разбавление цельного молока, преципитация с помощью щавелевой кислоты с дальнейшим разбавлением надосадочной жидкости после центрифугирования боратным буфером до концентрации кислоты 0,1%. Градуировочные зависимости, построенные для определения сульфаниламида на фоне матриц после пробоподготовки, представлены на рис. 4.

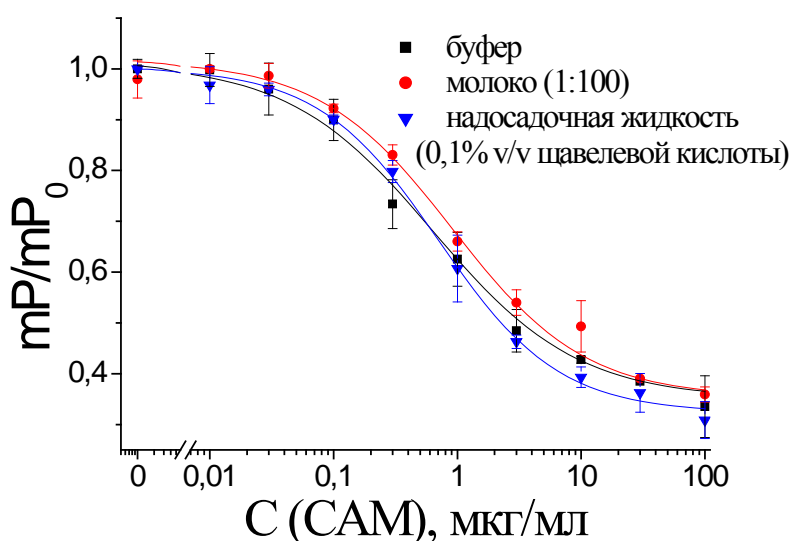


Рис. 4. Зависимости поляризации флуоресценции, измеренной на фоне буфера, разбавленного молока и надосадочной жидкости после преципитации белков молока с помощью щавелевой кислоты, от концентрации сульфаниламида.

Аналитические характеристики некоторых зависимостей представлены в табл. 8.

Таблица 8.

Аналитические характеристики зависимостей поляризации флуоресценции от концентрации сульфаниламида на фоне матрицы

Матрица	Разбавление/Содержание осадителя	IC ₅₀ , мкг/мл	ПрО, мкг/мл	Линейный интервал, мкг/мл
вода	—	0,7	0,03	0,1–4,1
молоко	1:100	0,9	0,15	0,2–5,0
надосадочная жидкость	0,1% щавелевой кислоты	0,7	0,08	0,1–3,3
	0,25% трихлоруксусной кислоты	1,0	0,22	0,2–4,0

ВЫВОДЫ

1) Разработаны конкурентный и неконкурентный варианты электроиммуноанализа для определения РНКаз на примере панкреатической РНКазы (барназы) и РНКазы *Bacillus intermedius* (биназы) с помощью амперометрических иммуно- и иммуноферментных сенсоров. В неконкурентном варианте C_n составила 1,2 и 3,1 мкг/мл, для панкреатической РНКазы и РНКазы *Bacillus intermedius*, соответственно, в конкурентном иммуноанализе РНКазы А - 21 нг/мл. Предложена модель амперометрического иммуносенсора для определения низкомолекулярного лекарственного соединения сульфаметазина. C_n составляет 5,3 нг/мл. Рабочие условия проведения иммуноанализа: рН трис буфера 7,8; потенциал окисления продукта ферментативной реакции – 500 мВ; концентрация субстрата БТХИ – 1 мМ; разведение антител для иммобилизации – 1:50 и 1:5 в неконкурентном и конкурентном иммуноанализе РНКазы, соответственно.

2) Получены конъюгаты ХЭ-РНКазы, СМЗ-БСА, антитела-ХЭ. Молярное соотношение компонентов в конъюгатах ХЭ: РНКазы и СМЗ-БСА составляет 1:5 и 1:21. Удельная каталитическая активность ХЭ в конъюгатах с РНКазой и антителами против СМЗ - 0,028 и 0,68 мМ/мг×мин. Синтезированы конъюгаты сульфонамидов с флуоресцентными метками с молярным соотношением компонентов 1:1.

3) Разработаны новые варианты конкурентного поляризационного флуоресцентного иммуноанализа низкомолекулярных лекарственных соединений сульфонамидного ряда (сульфаметазина, сульфадиазина, сульфаниламида). C_n сульфаметазина при использовании смеси поликлональных антител – 6 нг/мл; сульфадиазина с помощью гомологичных антител с индивидуальной специфичностью – 0,2, 0,9 и 51 нг/мл при использовании трейсеров СДЗ-ДТАФ, СМЗ-ДТАФ и СДЗ-ФИТС, и с помощью гетерологичных антител с индивидуальной специфичностью – 2,1 и 4 нг/мл при использовании трейсеров СДЗ-ДТАФ и СМЗ-ДТАФ, соответственно. C_n сульфаниламида с антителами против САБ – 0,03 мкг/мл.

4) ПФИА сульфадиазина с использованием гомологичного трейсера СДЗ-ДТАФ и антител против СДЗ оказался наилучшим: титр антител – 1:13000, концентрация трейсера – 3,4 нМ. Оптимальные характеристики иммуноанализа (титр антител, значения IC_{50} , C_n) с использованием антител против САБ были получены при использовании антител против гаптена, конъюгированного с СИТ после третьего цикла иммунизации. Рабочие условия проведения иммуноанализа с

использованием антисыворотки САБ-СИТ: концентрация трейсера САБ-ЭДФ – 0,26 нМ; титр антител – 1:600.

5) Установлено, что антитела, полученные на индивидуальную R-группу сульфонида, высокоселективны по отношению к сульфонида, который применяли для иммунизации. Кросс-реактивность антител против сульфадиазина по отношению к соединениям сульфонида ряда для большинства сульфонида составляет <0,1%, для сульфамеразина - 4,8%. Смесь поликлональных антител, полученная на индивидуальные фрагменты семи конъюгированных с белком сульфонида, обладает наибольшим сродством к сульфатиазолу (СТЗ), сульфаметоксазолу, сульфамеразину. Антисыворотка чувствительна к СТЗ независимо от структуры исследованных трейсеров, и может применяться для определения сульфатиазола с чувствительностью до 1 нг/мл. Антитела против синтетического гаптена N-сульфанил-4-аминобутановой кислоты показывают принципиально новую кросс-реактивность: по отношению к сульфаниламиду, сульфатуанидину, сульфаметоксипиридазину и сульфаклорпиридазину ее значения составляют 100, 96, 75 и 28%, соответственно.

6) Предложены методики иммунохимического определения РНКазы А и сульфонида препаратов в лекарственных формах, сыворотке крови, пищевых продуктах (молоко), природной воде. Проценты открытия – 97-105 %. При определении сульфаметазина в таблетках в качестве растворителей предпочтительнее использовать ацетонитрил и 0,1 М НСl. Наименьшие значения IC_{50} (0,9 и 0,7 мкг/мл) при определении сульфаниламида в молоке получены при использовании разбавленного молока и надосадочной жидкости после преципитации с помощью щавелевой кислоты. Относительное стандартное отклонение не больше 0,05.

Основные результаты диссертации изложены в следующих публикациях:

1. Муртазина Н.Р. Иммунохимическое определение сульфаниламидных антибиотиков с электрохимической детекцией / Н.Р. Муртазина, И.И. Галкина, Э.П. Медянцева, Г.К. Будников // Тез. докл. IV Всерос. конф. «Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии». – Саратов, 2003. – С. 178.

2. Муртазина Н.Р. Определение сульфадиазина с помощью иммунохимических методов анализа / Н.Р. Муртазина, Э.П. Медянцева, С.А. Еремин, Г.К. Будников // Тез. докл. XVII Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. – Казань, 2003. – С. 280.

3. Муртазина Н.Р. Амперометрический иммуноферментный сенсор в анализе сульфаниламидных антибиотиков / Н.Р. Муртазина, Э.П. Медянцева, Г.К.

Будников // Тез. докл. V Всерос. конф. по анализу объектов окружающей среды «Экоаналитика-2003» с международным участием. – СПб., 2003. – С. 328.

4. Murtazina N.R. Sulfamethazine – bovine serum albumin immunoconjugate used for competitive electrochemical immunoassay / N.R. Murtazina, E.P. Medyantseva, S.A. Eremin, H.K. Budnikov // Abstract of VIIth International Conference on Agri-Food Antibodies. – Uppsala, 2003. – P. 97.

5. Муртазина Н.Р. Иммунохимическое определение рибонуклеазы с амперометрическим детектированием / Н.Р. Муртазина, И.И. Галкина, Э.П. Медянцева, Г.К. Будников // Тез. докл. Всерос. конф., посвященной 100-летию со дня рождения академика И.П. Алимарина «Аналитика России». – М., 2004. – С. 214-215.

6. Муртазина Н.Р. Определение лекарственных препаратов с помощью поляризационного флуоресцентного иммуноанализа / Н.Р. Муртазина, И.С. Нестеренко, С.А. Еремин // Тез. докл. Всерос. конф., посвященной 100-летию со дня рождения академика И.П. Алимарина «Аналитика России». – М., 2004. – С. 197-198.

7. Murtazina N.R. Polarization fluoroimmunoassay for sulfadiazine using a high specificity antibody / N.R. Murtazina, S.A. Eremin, O.V. Mozoleva, S.J. Everest, A.J. Brown, R. Jackman // Intern. J. Food Sci. Tech. – 2004. – V. 39, № 8. – P. 879-891.

8. Муртазина Н.Р. Амперометрический иммуносенсор для конкурентного определения сульфаметазина / Н.Р. Муртазина, Э.П. Медянцева, Г.К. Будников // Сенсор. – 2004. – № 3. – С. 21-29.